



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA

TÍTULO

**EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Malva
Sylvestris* L. SOBRE *Escherichia coli* ATCC 8739 COMPARADO CON
GENTAMICINA ESTUDIO IN VITRO**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO
CIRUJANO**

AUTOR

DIEGO MAMANI AEDO

ASESORES

DRA. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ

MG. BLGO. JAIME POLO GAMBOA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

Trujillo – Perú

2019



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA

PÁGINA DEL JURADO

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Malva Sylvestris* L. SOBRE *Escherichia coli* ATCC 8739 COMPARADO CON GENTAMICINA ESTUDIO IN VITRO

Dr. Ana María Chian García

PRESIDENTE DE JURADO

Dra. María Rocío del Pilar Llaque Sánchez

SECRETARIO DE JURADO

Mg. Blgo. Jaime Polo Gamboa

VOCAL DE JURADO

Trujillo, 25 de Febrero del 2019

DEDICATORIA

A MI MADRE

Benigna Gregoria Aedo Flores, por ser mi más grande motivación y apoyo incondicional en todos los momentos buenos y malos a lo largo de toda mi vida académica. Gracias por ayudarme a cumplir mis sueños

A MI HERMANO

Yuri, por su constante apoyo incondicional en todo este tiempo y por alentarme y ayudarme cumplir este sueño. Gracias por ayudarme a enfrentar todos los obstáculos presentados desde el inicio hasta el final y por ser un gran amigo.

A MI FAMILIA

A pesar que en su gran mayoría se encuentran lejos les agradezco por su constante apoyo.

DIEGO MAMANI AEDO

AGRADECIMIENTO

A DIOS

Por ser la razón de mi existir, por ayudarme y alentarme en cada momento de mi carrera y por su gran amor incondicional para cumplir con esta hermosa carrera.

A MIS ASESORES

Dra. María Roció del Pilar Llaqué Sánchez.
Mg. Jaime Abelardo Polo Gamboa, por su infinita paciencia, dedicación y entrega para hacer realidad la ejecución de esta tesis.

A LA UNIVERSIDAD

Por darme la oportunidad y las herramientas necesarias a través de los grandes maestros que he tenido a lo largo de toda la carrera.

DIEGO MAMANI AEDO

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, **Diego Mamani Aedo** con **DNI 73033184**, estudiante de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la Facultad de Ciencias Médicas, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompañan a la Tesis titulada: **EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Malva Sylvestris* L. SOBRE *Escherichia coli* ATCC 8739 COMPARADO CON GENTAMICINA ESTUDIO IN VITRO**, son:

1. De mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas; por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido auto plagiado; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

DIEGO MAMANI AEDO

DNI: 73033184

Trujillo, 25 de Febrero del 2019.

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: **“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Malva Sylvestris* L. SOBRE *Escherichia coli* ATCC 8739 COMPARADO CON GENTAMICINA ESTUDIO IN VITRO.”**, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

DIEGO MAMANI AEDO

Índice

PÁGINA DEL JURADO	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD	iv
PRESENTACIÓN	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	9
1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA	9
1.2. TRABAJOS PREVIOS.....	10
1.3. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA	10
1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	15
1.6. HIPÓTESIS	15
1.7. OBJETIVOS	16
II. METODOLOGÍA.....	17
2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA.....	20
2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD....	21
2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS	21
2.6. ASPECTOS ÉTICOS:.....	22
III. RESULTADOS.....	23
IV. DISCUSIÓN	27
V. CONCLUSIONES.....	30
VI. RECOMENDACIONES	31
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXOS.....	35

RESUMEN

Se evaluó si el extracto etanólico de *Malva Sylvestris* L. “malva” tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 comparado con gentamicina a 10 µg. In vitro. El extracto fue obtenido a través del método de maceración y se realizaron cuatro diluciones, al 100%, 75%, 50%, 25%. Las cepas fueron cultivadas en agar Mueller-Hinton y la sensibilidad se realizó con Kirby-Bauer. Se encontró efecto inhibitorio a partir de la dilución al 50%, sin embargo, a partir del 100% muestra halo de inhibición de 15.70 mm (DS: 1.252±0.396 IC95% (14.80 – 16.60), con rango de 14 a 18 mm), con valores considerados eficaces según CLSI (≥ 15 mm). La gentamicina obtuvo halo inhibitorio de 21.50 mm (DS: 0.972±0.307 IC95% (20.80– 22.20), con rango de 20 a 23 mm). Según el análisis estadístico los resultados son altamente significativos (ANOVA – 0.000) pero los grupos heterogéneos (test de Dunnet), evidenciando que a mayor concentración del extracto aumenta el efecto inhibitorio pero no supera al de gentamicina. Se concluye que el extracto etanólico de *Malva Sylvestris* L. tiene efecto antibacteriano al aumentar la concentración del extracto (CLSI ≥ 15 mm), sin embargo es menor que el de la gentamicina.

Palabras claves: *Malva Sylvestris* L., malva, efecto antibacteriano.

ABSTRACT

It was determined whether ethanol extract of *Malva Sylvestris* L. "malva" has antibacterial effect on strains of *Escherichia coli* ATCC 8739 compared with gentamicin at 10 µg in-vitro. The extract was obtained through the maceration method and four dilutions were made, at 100%, 75%, 50%, 25%. The strains were cultivated in Mueller-Hinton agar and sensitivity was undertaken with Kirby-Bauer. Inhibitory effect was found from the 50% dilution, however, a zone of inhibition of 15.70 mm (SD: 1.252±0.396 CI95% (14.80 - 16.60) ranging from 14 to 18 mm) was obtained from the 100% sample, with values considered effective according to CLSI (≥15 mm). Gentamicin gave a zone of inhibition halo of 21.50 mm (SD: 0.972±0.307 CI95% (20.80- 22.20), ranging from 20 to 23 mm). According to the statistical analysis the results are highly significant (ANOVA - 0.000) but the heterogeneous groups (Dunnett's test) show that the higher the concentration of the extract, the greater the inhibitory effect, but it does not exceed that of gentamicin. It is concluded that the ethanol extract of *Malva Sylvestris* L. has an antibacterial effect by increasing the concentration of the extract (CSLI≥15 mm), however, it is lower than that of gentamicin.

Keywords: *Malva Sylvestris* L., malva, antibacterial effect.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA

Según la organización mundial de la salud (OMS) las enfermedades infecciosas generan alrededor de 13 millones de muertes en 12 meses de las cuales el 50 % se producen en países en desarrollo, solo en la siguiente hora 1500 personas habrán fallecido a causa de una enfermedad infecciosa. La organización panamericana de salud (OPS) junto con la OMS ha informado de un grupo de enfermedades infecciosas desatendidas (EID) en las Américas donde se indica que 1 de cada 6 personas presenta una EID en dichas patrias.¹

Las enfermedades infecciosas de origen bacteriano son un grupo importante de morbi mortalidad en los países en vías de desarrollo dentro de este grupo de patógenos *Escherichia coli* tiene una mayor importancia en relación a aquellas infecciones gastrointestinales y del tracto urinario esto se debe a algunas propiedades que favorecen su proliferación como es su mecanismo anaeróbico y la facultad que tiene para fermentar los hidratos de carbono, empero la mayoría de estas cepas de *E coli* no causan enfermedades infecciosas excepto por algún serotipo como es *E coli O-157:H7* la cual tiene la facultad de producir una toxina letal para el organismo la toxina *Shiga* generando una enfermedad hemolítica-urémica (SHU) en el 10 % de los casos.²

Según la OMS, alrededor del 65-80%, de la población mundial dependen esencialmente de las plantas para su atención primaria de salud en los países en desarrollo, debido a la pobreza y la falta de acceso a la medicina moderna, así mismo afirma que es muy importante que la medicina tradicional sea de calidad, seguridad y eficacia comprobada para asegurar el acceso a todas las personas en contribución de su salud. Por otro lado el creciente uso indiscriminado de antibióticos han generado una resistencia que hoy en día muchos de los grupos antibióticos (penicilinas, quinolonas y aminoglucocidos) que se encuentran en terapias de primera línea están siendo removidos generando preocupación en países en vías de desarrollo.³

Nuestra patria cuenta con más de 25, 000 tipos vegetales de los cuales 1300 presentan alguna propiedad medicinal que se viene utilizando desde tiempos ancestrales. Sin embargo, pocas plantas han sido científicamente estudiadas para la evaluación de su calidad, seguridad y eficacia. *Malva*

Sylvestris es una de las plantas con múltiples actividades biológicas debido a sus componentes como lo son los taninos y las antocianinas componentes moleculares considerados fitoalexinas que han demostrado una amplia efectividad en el tratamiento antibacteriano.⁴

1.2. TRABAJOS PREVIOS

Amini M. et al (Irán, 2017) determinaron el efecto antibacteriano de la *Malva Sylvestris* sobre cepas Gram positivas y Gram negativas a diferentes concentraciones, mediante el método de difusión en placas de agar. Los resultados encontrados para *E. coli* ATCC 25922 fue un halo de 17 mm, para *P. aeruginosa* ATCC 27853 fue de 21 mm, *S. áureas* ATCC 25923 un halo de 21 mm, donde a partir de estos resultados los autores concluyeron que *malva Sylvestris* tiene buen efecto antibacteriano tanto para cepas Gram positivas como las Gram negativas.⁵

Fareed A. (Iraq, 2017) identificó las diferentes propiedades farmacológicas a través de los componentes activos de la hoja de *Malva Sylvestris* sobre cepas bacterianas mediante el método de difusión en discos de agar a diferentes concentraciones del extracto etanólico de la hoja; utilizo el ciprofloxacino como antibiótico control. Los resultados encontrados fueron; al 100% de concentración del extracto etanólico la zona de inhibición para *Escherichia coli* fue de 10 mm, para *Pseudomona aeruginosa* de 11 mm, para *S saprophyticus* 12 mm. Ciprofloxacino tuvo una zona de inhibición de 15 mm. Concluyendo que malva tiene buen efecto antibacteriano.⁶

Mihaylova D. et al (Bulgaria, 2014) determinaron el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Malva Sylvestris* sobre diferentes tipos de cepas bacterianas a diferentes concentraciones mediante el método en placas de agar. Los resultados encontrados fueron para *E. coli* una zona de inhibición de 9 mm, para *salmonella sp.* 9.17 mm y para *S. áureas* 9 mm. Concluyen que la *Malva Sylvestris* tiene un buen efecto antibacteriano frente a patógenos entéricos.⁷

Fatima Z. et al (Algeria 2014) identificaron el efecto antibacteriano de *Malva Sylvestris* sobre cepas Gram positivas y Gram negativas mediante el método de difusión en placas de agar a diferentes contracciones, los resultados encontrados para *Escherichia coli* fue una zona de inhibición de 11 mm a una concentración de 30 ul, para *Staphylococcus áureas* no hubo inhibición (0 mm) a 30 ul y

para *Enterococcus fecalis* 13 mm de zona de inhibición, a una concentración de 30 ul. Concluyeron que la *malva* tiene mejor efecto antibacteriano sobre cepas Gram negativas que para Gram positivas.⁸

Seyed M. et al (Irán, 2011) evaluaron algunas bio-actividades de las flores y hojas de *Malva Sylvestris* sobre diversos microorganismos a través del método de difusión en disco a diferentes concentraciones, comparándolo con eritromicina y anfotericina B. Los resultados encontrados fueron: A la concentración de 1500 ug el halo de inhibición para *Escherichia coli* fue de 64 mm, en comparación con eritromicina que fue de 16 ug, así mismo para *Staphylococcus aureus* a una concentración de 1500 ug mostro un halo de 32 mm, en comparación con eritromicina que mostro 21 mm y finalmente para *Candida albicans* a una concentración de 1500 ug se mostró una zona de inhibición de 80 mm, en comparación con anfotericina B que mostro un halo de 24 mm. Se concluyó que *Malva Sylvestris* tiene un efecto superior a la eritromicina y anfotericina B sobre bacterias y hongos respectivamente considerándose como un componente importante para la medicina complementaria.⁹

Hojjati Z. (Irán, 2010) identificó el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Malva silvestres* a través del método de difusión en discos de agar, así como su concentración inhibitoria mínima (CIM). Los resultados: cuando evaluaron la actividad antioxidante (la acumulación de radicales superóxido en el extracto total de la planta) la concentración no fue apropiada. Sin embargo, para los ensayos antibacterianos, *Escherichia coli* fue susceptible al extracto metanólico, con una zona de inhibición de 15 mm. Conclusión: aunque los extractos totales de las plantas utilizadas en este estudio tenían actividades antimicrobianas apropiadas, sus efectos antioxidantes no fueron significativos.¹⁰

1.2. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

E. coli pertenece al grupo de los bacilos gram negativos, su cubierta está constituida por tres elementos: la membrana externa el espacio periplasmico rico en péptido-glucano y la membrana citoplasmática, es gracias a este conjunto de capas que le confieren a la bacteria una rigidez y le permite resistir a presiones osmóticas elevadas. Una de las características de proliferación de dicha bacteria es la temperatura a la que se encuentra (>15º C) es por ello que su habitat es aquellos animales de sangre caliente, así mismo la industria alimentaria mantiene sus productos por debajo

de temperaturas de 5º C para evitar su proliferación. Al mismo tiempo otro factor que favorece su proliferación es la cantidad de pH el cual es 7.2, por lo que se ve afectado en niveles de pH extremos.^{11, 12}

La clasificación se da por las diferentes características que presentan las cepas de *E. coli*. Los factores de virulencia fue la primera técnica para poder diferenciar las patógenas de las comensales, esta técnica está basada en la identificación de factores de virulencia directamente ligada a su potencial patógeno de *E. coli*. Su capacidad de adhesión esta descrito como uno de sus principales factores de virulencia ya que esto se produce por las fimbrias que se fijan de forma muy específica a la célula diana. Las fimbrias son complejos proteicos que se encuentran en la cara externa de la membrana.¹³

Las manifestaciones clínicas provocadas por *Escherichia coli* cambia dependiendo del lugar que este afecte. En el tracto genitourinario es la principal causa de infecciones del tracto urinario (ITU) la sintomatología se caracteriza por polaquiuria, disuria, piuria, empero el dolor la zona de la fosa renal está relacionada con una ITU alta, es grupo de cepas que colonizan el tracto urinario forman un grupo de factores proteolíticos que favorecen su colonización como lo es el antígeno K y la elaboración de fimbrias P. En el tracto gastrointestinal las cepas patógenas estarán diferenciadas por sus factores de virulencias las cuales se han descrito a *E.coli enteropatogena (EPEC)*, *E. coli enterotoxigenica (ETEC)* *E. coli de toxina shiga O157:H7 (STEC)*, *E. coli enteroinvasiva (EIEC)*, *E. coli enteroagresiva (EAEC)*.¹⁴

Desde la antigüedad, los productos naturales, especialmente los de origen vegetal, han sido consistentemente una fuente importante de agentes terapéuticos. Actualmente, alrededor del 25-30% de todos los medicamentos disponibles como productos terapéuticos se derivan de productos naturales (plantas, microbios y animales) o son derivados de productos naturales. A pesar de eso, en las últimas décadas, debido principalmente al avance de la química combinatoria, la investigación de productos naturales en la industria farmacéutica ha experimentado un lento declive. Sin embargo, la evidencia reciente de las compañías farmacéuticas muestra que, para algunas enfermedades complejas, los productos naturales todavía representan una fuente extremadamente valiosa para la producción de nuevas entidades químicas, ya que representan

estructuras privilegiadas seleccionadas por mecanismos evolutivos durante un período de millones de años.¹⁵

Malva Sylvestris está simbolizado por 40 taxones en todo el orbe, se describe como originaria de Europa occidental, Asia y África del norte, perteneciente al reino plantae en la clase angiospermas del orden malvales de la familia malváceas en el género malva y la especie Malva Sylvestris. Dentro de los nombres más comunes en Europa está la malva. Malva tiene una altura de maso menos 1 metro y preferentemente tiene un crecimiento en prados y campos.¹⁶

Malva Sylvestris morfológicamente está constituido por hojas peceoladas escasamente lobuladas y flores de coloración purpura que preferentemente tiene un florecimiento a finales de la primavera. M. sylvestris usualmente tiene fines culinarios, pero en su gran mayoría tiene un uso medicinal, se ha descrito que las hojas de la planta tienen efectos positivos en heridas dérmicas infectadas, neumopatías y problemas digestivos esto se debe al alto contenido de antocianinas y mucilago ¹⁷

M. sylvestris es una planta medicinal importante que muestra una amplia gama de actividades biológicas. La planta exhibe actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, cicatrizantes, hepatoprotectoras, antinociceptivas y antimicrobianas que se presentan a continuación. El análisis fitoquímico preliminar de M. sylvestris mostró la presencia de polisacáridos, cumarinas, flavonoides, malvivian, malvona A malvalina, escopoletina, polifenoles, niacina, ácido fólico, vitaminas (A, C, E) taninos. Antocianinas Los principales constituyentes de los flavonoides. También informaron la presencia de terpenoides como sesquiterpenos, diterpenos y monoterpenos.¹⁸

Actualmente la fitoterapia es considerada como aquella disciplina que se encarga de la utilización de los productos vegetales con finalidad terapéutica, para poder distribuir o tener un orden taxonómico en la caracterización de cada planta la fitoterapia utiliza a la planta medicinal considerado como toda planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden tener utilidad terapéutica, a su vez de dicha planta medicinal se extrae la droga vegetal que es considerado aquella parte de la planta (raíz, tallo, hojas, etc..) o derivado de estaos (goma, resina, latex, etc..) que luego de ser procesada por diferentes tipos de extracto o aceites esenciales

posibilitan su empleo medicinal. Así mismo de la droga vegetal se obtiene los principios activos que son los compuestos químicos presentes para la actividad farmacología.¹⁹

La actividad farmacológica de las drogas vegetales se basa en sus componentes, los cuales podemos clasificarlos en 3: los componentes inorgánicos como el agua y los minerales, después tenemos a los componentes que provienen del metabolismo primario que se refiere a aquellos que son de vital importancia en las plantas e interactúan con la célula vegetal (glúcidos, lípidos y aminoácidos) y finalmente tenemos a los componentes que provienen del metabolismo secundario ósea los que no son esenciales para la vida, dentro de estos tenemos a los terpenos, polifenoles, terpenosides y alcaloides, estos son utilizados para la defensa de dicha droga vegetal es por ello que se les atribuye el nombre de fitoalexinas.²⁰

Las fitoalexinas son la base farmacológica, bioquímica y fisiológica de la resistencia de la droga vegetal a la agresión de microorganismos como las bacterias y hongos; estos componentes se encuentran implicados en la síntesis de los metabolitos secundarios. La droga vegetal cuando está expuesta a una infección ocurren varios cambios, es por ello que expresa mecanismos de defensa, que provienen nunca antes mejor dicho del metabolismo secundario, en *Malva Sylvestris* se han identificado varios de estos metabolitos secundarios como son flavonoides, antocianinas, terpenos (sesquiterpenos, diterpenos) y la malvona A. El estímulo para la producción de los metabolitos secundarios son por medio de alguna exposición a dichos patógenos que inducen en la célula vegetal un mecanismo de defensa, por otro lado estos compuestos pueden ser liberados por hidrólisis enzimática.^{21, 22}

El mecanismo de acción de las fitoalexinas en algunos tipos de plantas no está plenamente identificado, pero se observado que existe diferente sensibilidad del patógeno a una fitoalexina dada. El medio por el cual las fitoalexinas alcanzan su efecto tóxico no es aun claro, pero se cree que interactúa en diferentes sitios causando una disfunción en la integridad de la membrana del microorganismo.^{23, 24}

1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿El extracto etanólico de *Malva Sylvestris* L. “*Malva*” posee efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739, comparado con Gentamicina, estudio in vitro?

1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Escherichia coli es un patógeno productor de infecciones intestinales muy frecuentes y severas, reportándose un aumento de la resistencia a los antimicrobianos de uso común, por cuyo motivo se está recurriendo de manera constante a la búsqueda de alternativas eficaces y seguras que provienen de recursos naturales, donde sus principios no causan reacciones indeseables. Bajo el conocimiento de la existencia de aceites esenciales y extractos con propiedades antisépticas y bactericidas de varias plantas en nuestra región, campo que por lo demás es poco explorado, aunque si en muchos países del mundo, es que se pretende realizar la presente investigación, la cual busca conocer si el Extracto etanólico de la hoja de *Malva Sylvestris* L. (*Malva*) tiene acción bactericida contra *Escherichia coli*, ya que los resultados afirmativos supondrían información alentadora que permita plantear alternativas para la obtención de un preparado antimicrobiano útil, sin efectos indeseables y económico, para dicho patógeno

1.6. HIPÓTESIS

H₁: El extracto etanólico de *Malva Sylvestris* L. “*Malva*” tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 comparado con Gentamicina. In vitro.

H₀: El extracto etanólico de *Malva Sylvestris* L. “*Malva*” no tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 comparado con Gentamicina. In vitro.

1.7. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar si el extracto etanólico de *Malva Sylvestris L.* “*Malva*” tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 comparado con Gentamicina. In vitro

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la eficacia del extracto etanólico de la hoja de *Malva Sylvestris L.* al 100%.
- Establecer la eficacia del extracto etanólico de la hoja de *Malva Sylvestris L.* al 75%.
- Establecer la eficacia del extracto etanólico de la hoja de *Malva Sylvestris L.* al 50%.
- Establecer la eficacia del extracto etanólico de la hoja de *Malva Sylvestris L.* al 25%.
- Establecer la eficacia del Gentamicina a la concentración de 10 µg.

II. METODOLOGÍA

2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico

DISEÑO DE INVESTIGACION: Experimental: de series de tiempo con repeticiones múltiples, post prueba.

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	----	O6

Donde:

RG: Grupos de estudio

X1: Dilución del extracto etanólico de *Malva Sylvestris* L. "malva" al 100%

X2: Dilución del extracto etanólico de *Malva Sylvestris* L. "malva" al 75%

X3: Dilución del extracto etanólico de *Malva Sylvestris* L. "malva" al 50%

X4: Dilución del extracto etanólico de *Malva Sylvestris* L. "malva" al 25%

X5: Tratamiento con Gold Estándar: Gentamicina 10ug

X6: Control negativo: suero fisiológico

O: Las observaciones del diámetro del halo de inhibición

2.2 VARIABLES Y OPERALIZACIÓN

VARIABLE INDEPENDIENTE: Agente antibacteriano para cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739

- **Agente antibacteriano no farmacológico:** Extracto etanólico de la hoja de *Malva Sylvestris* l. "malva"
- **Agente antibacteriano farmacológico:** Gentamicina a la concentración de 10 µg

VARIABLE DEPENDIENTE: efecto antibacteriano

- **Si efecto antibacteriano:** aumento del halo de inhibición $\geq 15\text{mm}$.
- **No efecto antibacteriano:** disminución del halo de inhibición $< 15\text{mm}$.

Operacionalización de variables:

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Agente antibacteriano	Sustancia producida por microorganismo s o sintetizada químicamente que es capaz de inhibir y/o destruir microorganismo s sin producir efecto toxico en el huésped ¹²	La Malva Sylvestris l. (malva) será dividida en las siguientes diluciones: 100% 75% 50% 25% Gentamicina a una concentración de 10ug Suero fisiologico	RG1 RG2 RG3 RG4 RG5 RG6	Cualitativa nominal
V. D: Efecto antibacteriano	Inhibición del crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar el organismo infectado ¹³	Se medirá mediante el incremento de halo de inhibición por medio del método de Kirby Bauer. Se considera: ²⁶ Sensible: ≥ 15 mm Intermedio: 13-14 mm Resistente: ≤12mm	Si efecto antibacteriano: ≥ 15 mm No efecto antibacteriano: <= 15 mm	Cualitativa nominal

2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

POBLACIÓN: Estuvo constituida por todas las cepas de *E. coli* ATCC 8739, cultivadas en el laboratorio clínico de San Jose.

MUESTRA:

Tamaño muestra:

Por tratarse de un trabajo experimental se empleó la formula estadística de diferencia de promedio sobre halos de inhibición, para hallar el número de placas necesarias que validen la investigación.²⁵
(Ver Anexo 01)

Unidad de análisis: Cada uno de los cultivos de cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739

Unidad de muestra: Cada placa Petri con cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739

Muestreo: se analizó el crecimiento de todas las bacterias.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

- las placas petri donde hubo crecimiento de bacterias

Criterios de exclusión:

- Cepas que no crecieron en el medio de cultivo.
- Cepas o muestra contaminada.

2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

LA TÉCNICA:

Consistió en la observación directa de los cultivos de cada grupo de cepas en las placas Petri.²⁶

PROCEDIMIENTO: se consideraron los siguientes pasos.²⁶ (Ver Anexo 02)

- a. Tipificación de la planta por el Laboratorio de biología de la Universidad Particular Antenor Orrego.
- b. La obtención del principio activo (extracto etanólico) del *Malva Sylvestris* L. (*malva*) fue mediante la técnica de maceración.
- c. El proceso de cultivo de la bacteria fue mediante el método de Agar Muller Hinton.
- d. Se evaluó la susceptibilidad antibacteriana siguiendo las normas y procedimientos establecidos en los estándares M100-S28¹⁹ del CLSI.

INSTRUMENTO:

El instrumento que se utilizará será la ficha de recolección de datos que consistió en observar las placas, diluciones y halos de inhibición a las 48 ó 72 horas.²⁷ (Ver Anexo 03).

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

El instrumento fue validado por tres expertos 2 microbiólogos y 1 medico.²⁷ (Ver anexo 04)

2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

La información fue tabulada en una ficha Excel, y luego se analizó en el programa SPSS versión 21.1. Para el gráfico se utilizó el diagrama de cajas o bigotes.

Se aplicaron las pruebas estadísticas para homogenizar la muestra y luego análisis de varianza (ANOVA), para evaluar la diferencia significativa entre los diámetros.²⁵

2.6. ASPECTOS ÉTICOS:

En el estudio se tomó en cuenta las medidas de bioseguridad en el laboratorio dadas por el Ministerio de Salud. (Ver Anexo 05) Así mismo se consideró la aprobación del Comité de Investigación de la Facultad De Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo de Trujillo.

En el presente trabajo se respetó el principio de ética adoptado en el capítulo 6 de código de ética del Colegio Médico del Perú, especialmente el 6 art 48.³⁰

III. RESULTADOS

Tabla 1. EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS de *Malva Sylvestris* L. “malva” SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 8739 COMPARADO CON Gentamicina, ESTUDIO IN VITRO

DATOS DESCRIPTIVOS								
Tratamiento	N	Media	Desv.	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
100%	10	15,70	1,252	0,396	14,80	16,60	14	18
75%	10	13,40	0,699	0,221	12,90	13,90	12	14
50%	10	4,60	3,978	1,258	1,75	7,45	0	8
25%	10	0,00	0,000	0,000	0,00	0,00	0	0
Gentamicina	10	21,50	0,972	0,307	20,80	22,20	20	23

Fuente reporte de resultados del SPSS versión 25

Tabla 2. EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS de *Malva Sylvestris* L. “malva” SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 8739 COMPARADO CON GENTAMICINA, ESTUDIO IN VITRO

ANALISIS DE VARINZA (ANOVA)					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3000,520	4	750,130	199,267	0,000
Dentro de grupos	169,400	45	3,764		
Total	3169,920	49			

P: 0.000

Fuente reporte de resultados del SPSS versión 25

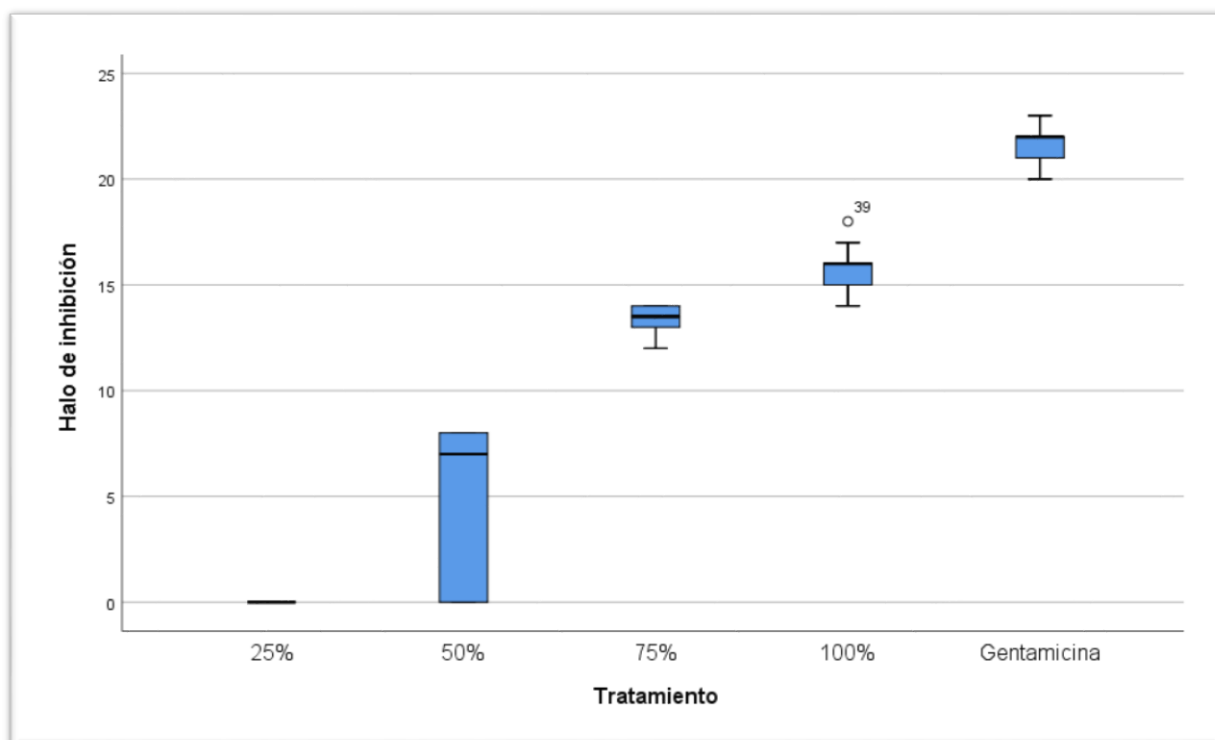
Tabla 3. EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS de *Malva Sylvestris* L. “malva” SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 8739 COMPARADO CON GENTAMICINA, ESTUDIO IN VITRO

ANALISIS DE HOMOGENEIDAD DE LOS DATOS: DUNNETT						
HSD T3 Dunnett						
Subconjunto para alfa = 0.05						
Tratamiento	N	1	2	3	4	5
25%	10	0,00				
50%	10		4,60			
75%	10			13,40		
100%	10				15,70	
Gentamicina	10					21,50
Sig.		1,000	1,000	0,078	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

Fuente reporte de resultados del SPSS versión 25



Fuente reporte de resultados del SPSS versión 25

GPRÁFICO 1. EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS de *Malva Sylvestris* I. “malva” SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 8739 COMPARADO CON GENTAMICINA, ESTUDIO IN VITRO

IV. DISCUSIÓN

El presente estudio evalúa y establece el efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Malva Sylvestris L.* a diferentes concentraciones (100%, 75%, 50% y al 25%), mediante el método de difusión en discos de agar, sobre *Escherichia coli ATCC 8739*, así mismo se utilizó como un control positivo a *Gentamicina* de 10ug y como control negativo se utilizó suero fisiológico.

En la tabla N° 1 se muestra el efecto antibacteriano del extracto etanólico *Malva Sylvestris L.* “malva” expresado en halos de inhibición sobre cepas de *Escherichia coli ATCC 8739*, donde se evidencia que a la concentración del 25% no evidenció efecto inhibitorio, a partir de la concentración al 5% se observa un halo de inhibición de 4.60 mm (DS: 3.978 ± 1.258 . IC 95% (1.75 - 7.45) con un rango de 0 a 8 mm), considerándose resistente según CLSI (>15mm). Al 75% tuvo un halo de inhibición de 13.40 mm (DS: 0.699 ± 0.221 . IC 95% (12.90 – 13.90) con un rango de 12 a 14 mm) considerando estos valores como intermedio; la concentración del 100 % presentó un halo de inhibición de 15.70 mm (DS: 1.252 ± 0.396 . IC 95% (14.80 – 16.60) con un rango de 14 a 18 mm) se considera sensible según el CLSI (>15 mm), sin embargo esta concentración no supera al grupo control de gentamicina que obtuvo un halo de inhibición de 21.50 mm (DS: 0.972 ± 0.307 . IC 95% (20.80– 22.20) con un rango de 20 a 23 mm). Por lo tanto, se evidenció que al aumentar la concentración del extracto, el efecto inhibitorio fue mayor.

En la tabla N° 2 se evidencia que estadísticamente los resultados son altamente significativos (ANOVA – 0.000) pero los grupos heterogéneos (Tabla N°3: test de Dunnet), evidenciando que a mayor concentración del extracto aumenta el efecto inhibitorio pero no supera al de gentamicina. Lo expuesto se evidencia gráficamente en el Gráfico 1.

Los resultados encontrados fueron similares a los de **Hojjati Z.**⁷ el cual encontró un halo de inhibición para *Escherichia coli* de 15 mm, **Fatima Z. et al**⁸ 11 mm, estas diferencias en los resultados puede deberse a la influencia que tiene el medio geográfico de donde se recolectó la *Malva Sylvestris L.* y el tipo de procesamiento al obtener los diferentes tipos de extractos, entre otros.

Por otra parte, nuestros resultados muestran resultados superiores que el de **Fareed A⁶** quien encuentra un halo de inhibición para *Escherichia coli* de 10 mm a una concentración del 100%, este resultado puede deberse a que dicho autor trabajo con extracto acuoso y no con extracto etanólico como lo describe esta tesis, por otro lugar las cepas utilizadas para el estudio de Fareed A. fueron aisladas de pacientes infectados y no las cepas estandarizadas como se realizó en esta tesis, por otra parte **Mihaylova D. et al⁷** encontró un halo de inhibición para una cepa estandarizada (*Escherichia coli* ATCC 25922) de 9 mm, así mismo dicho autor trabajo con la cepa estandarizada de *Escherichia coli* ATCC 8739, la misma cepa bacteriana que se utilizó en el desarrollo de esta tesis y dicho autor reporto un halo de inhibición de 0 mm, estos resultados pueden ser explicados por que dicho autor trabajo con tres tipos de extracción para obtener el extracto (decocción, infusión y extracción asistida por microondas (MAE) en comparación a la extracción por maceración que se utilizó en esta tesis.

También nuestro resultados mostró valores menores que lo reportado por **Hojjati Z¹⁰** cuyo estudio reportó un halo de inhibición de 64 mm para *Escherichia coli* PTCC 1047, estos resultados pueden ser explicados por que en dicho estudio se utilizaron cepas estandarizadas como son la colección de cultivos tipo persa (PTCC) a diferencia de los microorganismo que se realizó en este estudio son la colección de cultivos tipo americanos (ATCC).

La diferencia con otros autores puede deberse a la influencia que tiene el medio ambiente de donde se recolecta la planta, como podemos ver la mayoría de los autores son del continente asiático (minerales de la tierra de cultivo, terreno, humedad, mes del año en que se recolecta, altitud en donde se recolecta, entre otros) sobre el crecimiento de la planta, ya que todos estos factores con influyentes a la hora de la composición y la cantidad de los componentes activos, por otra parte muchos de los autores que realizaron el efecto antibacteriano utilizaron diferentes tipos de método para la obtención del extracto, así mismo las cepas bacterianas utilizadas en todos los estudios no fueron estandarizadas.

M. sylvestris es una planta medicinal importante que muestra una amplia gama de actividades biológicas. Sabemos que la planta tiene múltiples funciones medicinales esto se debe al producto de sus metabolismo secundario como son los flavonoides, malvivián, malvona A malvalina, escopoletina, polifenoles, niacina, ácido fólico, vitaminas (A, C, E) taninos, dichos componentes son

ampliamente reconocidos por **Hojjati Z.**⁷, **Fatima Z. et al**⁸, **Fareed A**⁶, **Mihaylova D. et al**⁷, **Hojjati Z**¹⁰. La actividad farmacológica de las drogas vegetales se basa en sus componentes que son utilizados para la defensa de dicha droga vegetal es por ello que se les atribuye el nombre de fitoalexinas. Dichos componentes activos no se sabe con exactitud su mecanismo de acción sobre las bacterias, pero se cree que tiene potencial actividad sobre sus membrada, en particular la malva no tiene el mecanismo de acción, pero en otras plantas como el frijol ya identificaron el mecanismo de acción de esta fitoalexinas^{20, 18}

V. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de la hoja de *Malva Sylvestris* L. “malva” demostró tener efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 a medida que aumentaba la concentración siendo considerados como susceptibles CLSI (≥ 15 mm). Sin embargo, los halos de inhibición fueron menores que de la gentamicina.
- El extracto etanólico de la hoja de *Malva Sylvestris* L. no presentó efecto inhibitorio con un halo de inhibición de 0 mm, a la concentración de 25%
- El extracto etanólico de la hoja de *Malva Sylvestris* L. al 50% mostró un halo de inhibición de 4.06 mm, considerado resistente.
- El extracto etanólico de la hoja de *Malva Sylvestris* L. al 75% presentó un halo de inhibición de 13.40 mm, considerado indiferente al 75%
- El extracto etanólico de la hoja de *Malva Sylvestris* L. al 100% presentó un halo de inhibición de 15.70 mm, considerado susceptible.
- La Gentamicina a 10 μg presentó halo de inhibición de 21.50 mm, mayor que el del extracto etanólico de la *Malva Sylvestris* L.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios usando el extracto etanólico de la flor de *Malva Sylvestris* L. bajo las mismas condiciones de este estudio y realizar un análisis comparativo.
- Realizar estudios microbiológicos para la extracción de los principales componentes activos con efecto antibacteriano.
- Realizar estudios comparativos sobre el efecto antibacteriano del extracto etanólico y aceites esenciales de *Malva Sylvestris*

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Medicina general. OMS. Informe de la OMS sobre las enfermedades infecciosas: INTRAMED [internet]. [Consultado 3 Ago 2018]. Disponible en: <https://www.intramed.net/contenido.asp?contenidoID=43253>
2. Hernández C. Aguilera M. Castro G. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. ENF INF MICROBIOL: [internet] 2011 [Consultado 22 ago 2018]; 31 (4): 137-151 Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2011/ei114f.pdf>
3. OMS. Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional, 2014-2023. [internet]. [Consultado 30 Ago 2018]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
4. Joao B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America a personal view. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY: [internet] 2014 [Consultado 15 sep 2018]; 27 (4): 117-141 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105003612?via%3Dihub>
5. Amini M. Abdolhossein R. Mahdih A. Essential oils of malva sylvestris L. and its antimicrobial activity. EJPMR: [internet] 2017 [Consultado 10 sep 2018]; 4 (07): 219-221 Disponible en: http://www.ejpmr.com/admin/assets/article_issue/1498811799.pdf
6. Fareed A. Ali K. Using aqueous extract of malva sylvestris as inhibitor for the growth of some microorganisms that cause urinary tract infections: IJABR: [internet] 2017 [Consultado 10 sep 2018]; 7 (02): 329-334 Disponible en: [http://scienceandnature.org/IJABR_Vol7\(2\)2017/IJABR_V7\(2\)17-27.pdf](http://scienceandnature.org/IJABR_Vol7(2)2017/IJABR_V7(2)17-27.pdf)
7. Mihaylova D. Popova A. Denkova R. Alexieva I. Krastanov A. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of extracts of bulgarian malva sylvestris. ENF MICROBIOL: [internet] 2014 [Consultado 22 ago 2018]; 31 (4): 137-151 Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/279538585/download>
8. Fatima Z. Sabría M. Samira J. Sabrib Fatty acids profile and antimicrobial activities of the seed oil of malva sylvestris L. from algeria. EJPMR: [internet] 2017 [Consultado 10 sep 2018]; 4 (07): 219-221 Disponible en: <http://www.isaet.org/images/extraimages/D313032.pdf>
9. Seyed M. Gholamreza Z. Ghader M. Ghader G. Bioactivity of Malva Sylvestris L., a Medicinal Plant from Iran. EJPMR: [internet] 2017 [Consultado 15 sep 2015]; 4 (02): 111-281 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3586856/pdf/IJBMS-14-574.pdf>

10. Hojjati Z. Evaluación de actividades antioxidantes y antimicrobianas de extracto metanólico de *Malva sylvestris* y *Lowsonia inermis* en bacteria intestinal. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY: [internet] 2014 [Consultado 15 sep 2018]; 27 (4): 117-141
Disponible en: http://jmw.jia.ac.ir/article_2260_en.html
11. Brooks G. Carrol K. Buyel J. Morse S. Migtzner T. Microbiología médica. 25ª edición. Colombia, Santa Fe: Mc Graw Hill; 2010.
12. Forbes B. Sanm D. Weissfeld A. Trevio E. Diagnostico microbiológico. 11ª edición. Uruguay.: Editorial Medica Panamericana; 2004.
13. Murray P. Rosenthal K. Pfaller M. Microbiologia medica. 6ª edición. Barcelona, España: El Sevier Masson; 2009.
14. Donarus A. Farreras P. Rozman C. Cardelach F. Medicina interna. 17ª edición. Barcelona, España: El Sevier Masson; 2012.
15. Krapp K. Longe J. Medicina alternativa. 1ª edición. Barcelona, España: Oceano/Ergon; 2010.
16. Cebrian J. Diccionario de plantas medicinales. 1ª edición. Barcelona: Integra; 2012.
17. Garcia F. Mostacero J. Flora etnomedicinal de la región amazónica del Perú. 1ª edición. Trujillo, Perú; 2009.
18. Dipak P. A review on biological activities of common mallow *Malva sylvestris* L. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY: [internet] 2014 [Consultado 15 sep 2018]; 27 (4): 117-141
Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/308779402_A_REVIEW_ON_BIOLOGICAL_ACTIVITIES_OF_COMMON_MALLOW_MALVA_SYLVESTRIS_L
19. Mendes C. Lopez M. Lazzarini J. Soares J. Edmund J. Baracat C. Phytotherapy: yesterday, today, and forever? REV ASSOC MED BRAS 2018; 64(9):765-768. [Citado: 2018 Dicm 1].
Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/ramb/v64n9/1806-9282-ramb-64-9-0765.pdf>
20. García R. Pérez R. FITOALEXINAS: MECANISMO DE DEFENSA DE LAS PLANTAS. RCHSCFA, 2003; 9(1): 5-10. [Citado: 2018 Nov 11]. Disponible en: <https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/Garcia-y-Perez-2003.pdf>
21. Regina S. David R. Morrel J. Rusty J. Biochemical Analysis of Plant Protection Afforded by a Nonpathogenic Endophytic Mutant of *Colletotrichum magna*. PLANT PHYSIOLOGY, 1999; Vol. 119: 795–804. [Citado: 2018 Nov 11]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC32157/pdf/795.pdf>
22. Bolanle C. Kimberly-Ann M. Hope D. Biological Activities of Stilbenoids. INT. J. MOL. SCI. 2018; 19- 792. [Citado: 2018 Nov 11]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5877653/pdf/ijms-19-00792.pdf>

23. Ebel J. The Biochemical Analysis of the Induction Process. ANN REV PHYTOPATHOL, 1986; vol 24: 235-264. [Citado: 2018 Nov 11]. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.py.24.090186.001315>
24. Jeandet P. Structure, Chemical Analysis, Biosynthesis, Metabolism, Molecular Engineering, and Biological Functions of Phytoalexins. MOLECULES 2018, 23, 61. [Citado: 2018 Nov 11]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017555/pdf/molecules-23-00061.pdf>
25. Dawson B. Trapp R. Bioestadística Médica, 3ra. ed. México: Manual Moderno; 1999.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI Supplement M100S. 19087 USA, 2016. [citado: 25 de May de 2017]. Disponible en: <http://ijzx.cqrmhospital.com/upfiles/201601/20160112155335884.pdf>
27. Ministerio de Salud del Perú. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002. [citado: 2017 25 de mayo del 2017]. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/manua_l%20sensibilidad.pdf
28. Peredo H. Palou E. López A. Aceites esenciales método de extracción. Temas selectos de ingeniería de alimentos. Journal plant. 2009 3-1. p24-32. [citado: 2017 May 22]. Disponible en: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
29. Sistema de Gestión de la Calidad del Pronahebas, Ministerio de Salud (MINSA). Manual de Bioseguridad: Programa Nacional de Hemoterapia y Bancos de Sangre, 2004. norma técnica N° 015 - MINSA / DGSP - V.01. 2004. Perú. [citado: 2017 Jun 2]. Disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/dgsp/observatorio/documentos/infecciones/manual%20de%20bioseguridad.pdf>
30. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima [Perú]: CMP; 2007. [citado: 2017 Jun 2]. Disponible en: http://cmp.org.pe/wp-content/uploads/2016/05/ley_creacion_cmp.pdf

ANEXOS

ANEXO 01

FORMULA ESTADISTICA

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

$$Z_{\frac{\alpha}{2}} = 1.96$$

$$Z_{\beta} = 0.84$$

$$\bar{x}_1 = 15 \text{ mm}^2$$

$$\bar{x}_2 = 10 \text{ mm}^2$$

$$\sigma = 2.5$$

$$n = 10 \text{ (número de placas mínimas)}$$

Teniendo en cuenta la pérdida de las muestras se usará 10 placas Petri y se realizarán 60 observaciones.

ANEXO 02: certificación de la planta





UPAO

Museo de Historia Natural y Cultural

HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)

CONSTANCIA N° 08-2019-HAO-UPAO

El que suscribe, Director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, deja:

CONSTANCIA

Que Diego Mamani Aedo, estudiante de la carrera profesional de Medicina Humana de la Universidad César Vallejo, ha solicitado la determinación de material vegetal, el cual corresponde a la siguiente especie:

Malva sylvestris L. (Malvaceae)

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: «Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Malva sylvestris* L. sobre *Escherichia coli* ATCC 8739 comparado con gentamicina. Estudio *in vitro*».

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que correspondan.

Trujillo, 14 de febrero de 2019



Segundo Letiva
Mg. Segundo Letiva González

Director

Museo de Historia Natural y Cultural

ANEXO 03

PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HOJA DE *Malva Sylvestris* L.

PROCEDIMIENTO

1. Tratamiento de la muestra

Las hojas frescas de *Malva Sylvestris* “malva”, se obtuvieron en el mercado zonal Palermo de Trujillo, procedentes de la localidad de Shirán, La Libertad, en una cantidad de 4 Kg aproximadamente y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionaron los ejemplares con buenas condiciones. Las hojas se lavaron con agua corriente y después con agua destilada clorada. Se colocaron sobre papel absorbente hasta quitarles los residuos de agua. Luego, se colocaron en una bandeja de cartulina y se llevó al horno a deshidratar por convección a 40-45°C por 48 horas. Después, se trituró manualmente hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolo herméticamente en una bolsa negra.



2. Obtención del extracto etanólico

El extracto etanólico de *Malva Sylvestris L.* se obtuvo por el método de maceración en etanol de 96°; para ello, se colocó en un frasco de vidrio 20 g de la muestra deshidratada y triturada y 100 ml de etanol, se tapó el frasco herméticamente y se envolvió totalmente con papel aluminio. Luego, se llevó al horno a 40-45°C por 8 días con agitación de 4 veces



diarias. Después, se hizo una doble filtración. Primero se filtró a través de una gasa estéril y segundo a través de un papel filtro Whatman N°41. Este filtrado, se evaporó por convección en estufa a 40-45°C, por 1 a 2 días, hasta que quede a una concentración mayor a 200 mg/mL. De este modo, se obtuvo el extracto etanólico (EE) considerado al 100%; el cual, se reservó en un frasco de vidrio ámbar a 4°C–6°C hasta su utilización.



3. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Mueller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.



4. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M02 y M100.

a) Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 2-3 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Escherichia coli*, cultivado hace 24 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml aprox.)



b) Siembra del microorganism

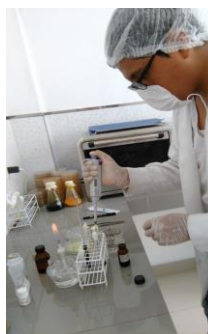
Se sembró el microorganismo *Escherichia coli*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por

estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.



c) Preparación de las concentraciones del EE

A partir del EE, se prepararon 3 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfóxido (DMSO); para ello, se rotularon 3 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750 μL de EE y 250 μL de DMSO al tubo de 75%, 500 μL de EE y 500 μL de DMSO al tubo de 50%, y 250 μL de EE y 750 μL de DMSO al tubo de 25%.



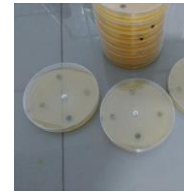
d) Preparación de los discos de sensibilidad con EE

A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10 μ L en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10 μ L de EE al 25% y se colocó en un disco, 10 μ L de EE al 50% en otro disco, 10 μ L de EE al 75% en otro disco y 10 μ L de EE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.



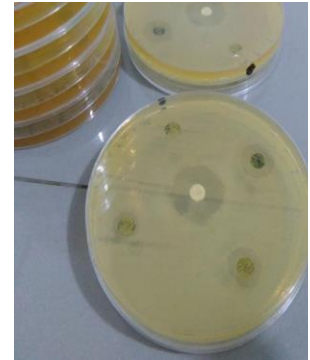
e) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con EE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Escherichia coli*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con Gentamicina (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.



f) Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de EE de *Malva sylvestris* y para la Gentamicina. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100 del CLSI.



ANEXO 04

INSTRUMENTO

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos obtenidos serán registrados en la siguiente ficha:

Método empleado: Kirby-Bauer

Cepa empleada: *Escherichia coli* ATCC 8739

Extracto etanólico de *Malva Sylvestris* L. "Malva".

ZONA DE INHIBICIÓN (mm)						
Numero de repeticiones	Extracto etanólico de Malva				Control positivo Gentamicina	Control negativo DMSO
	100%	75%	50%	25%		
1	16	13	7	0	23	0
2	15	14	8	0	20	0
3	17	14	0	0	22	0
4	14	12	8	0	22	0
5	16	14	0	0	22	0
6	16	13	0	0	21	0
7	15	13	7	0	22	0
8	14	14	8	0	20	0
9	18	14	8	0	21	0
10	16	13	0	0	22	0

ANEXO 05

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO POR CADA EXPERTO

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO (Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)		CONSTRUCTO (Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)		RELEVANCIA (El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)		COHERENCIA INTERNA (El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)		CLARIDAD (El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)		SUFICIENCIA (Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	X		X		X		X		X		X	
2	X		X		X		X		X		X	
3	X		X		X		X		X		X	

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES				SI	NO	OBSERVACIONES
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos				X		
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación				X		
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial				X		
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir				X		
VALIDEZ						
APLICABLE		X	NO APLICABLE		APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN	

Validado por:

Fecha:


 Juan Carlos Gamboa
 Firma y sello


 Steve T. Hurtado Escamilo
 MICHONOLLOPOTECAL
 Secretaría de Salud
 GBT-2255 Hualt
 2013
 Firma y sello


 María S. Ayala Ravelo
 Doctora en Salud Pública
 Docente Facultad Medicina
 UNTEL
 Firma y sello

ANEXO 06

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL ESTUDIO EXPERIMENTAL²⁸

AMBIENTE SEGURO:

Limpieza: se lavará con agua y detergente, luego sin éste, realizando una acción mecánica o de arrastre sobre las superficies. La limpieza se realizará antes de todos los procedimientos de desinfección y esterilización todas las áreas.

La limpieza se realizará con paños húmedos y el barrido por medio de escoba húmeda, con la intención de prevenir la resuspensión de los microorganismos que se encuentran en el piso. Se iniciará por las partes más altas, siguiendo la línea horizontal, descendiendo por planos.

Desinfección: Se realizará utilizando principalmente agentes químicos en estado líquido, como el alcohol a 70%, la pasteurización a 75°C y la irradiación ultravioleta.

Descontaminación: Se realizará un tratamiento químico aplicado a objetos que tuvieron contacto con sangre o fluido corporales, con el fin de inactivar microorganismos en piel u otros tejidos corporales.

Esterilización: Esterilización por vapor, esterilización por calor seco, esterilización por inmersión en productos químicos.

PROTECCIÓN CORPORAL

Se hará uso de mandiles o batas, siendo esta una prioridad multifactorial para el ingreso a l área de trabajo, y en la realización de todos los procedimientos por parte de los integrantes del equipo.

Recomendaciones:

- Se usará bata, chaqueta o uniforme dentro de las instalaciones de trabajo (laboratorio).
- Esta ropa protectora fue retirada inmediatamente antes de abandonar el laboratorio.

- Fue transportada de manera adecuada a un lugar para posterior descontaminación y lavado.

PROTECCIÓN OCULAR Y TAPABOCA

El uso de lentes y de mascarillas tiene como fin proteger las membranas de las mucosas de boca, nariz y ojos durante los procedimientos y actividades que puedan generar aerosoles, y salpicaduras de fluidos.

Anteojos o lentes de Seguridad:

- Permiten una correcta visión.
- Tienen protección lateral y frontal, ventilación indirecta, visor de policarbonato, sistema antirrayaduras y antiempañantes.
- Permiten el uso simultáneo de lentes correctores.
- Son de uso personal.
- Serán usados en todo momento durante los procesamiento de las muestras y el fraccionamiento de las unidades de fluidos. Cualquier excepción a esta regla, fue descrita en el programa de bioseguridad del servicio.

TAPABOCA:

- Es de material impermeable frente a aerosoles o salpicaduras.
- Es amplio de tal forma que cubre la nariz y toda la boca.
- Será utilizado por el equipo durante todo el tiempo manteniéndolo limpio y sin deformación. Esto debido al tiempo de uso y cuidados que recibe.

PROTECCIÓN DE LOS PIES:

La protección se realizará para evitar lesiones producidas por sustancias corrosivas, descargas eléctricas, objetos pesados, así como para prevenir deslizamientos en pisos húmedos. Si cayera al suelo una sustancia corrosiva o un objeto pesado.

No se llevara ninguno de los siguientes tipos de calzados para transitar en el laboratorio:

- Zuecos
- Tacones altos
- Zapatos que dejen el pie al descubierto

Se elegirá un calzado de cuero resistente que cubrió todo el pie. Este tipo de calzado proporciono una mejor protección.

PROTECCIÓN DE LAS MANOS

Se hará uso de guantes para prevenir o disminuir el riesgo de contaminación con los microorganismos de la piel del operador, como de la transmisión de gérmenes manipulados hacia el operador. Las manos fueron lavadas según técnica clínica con solución a base de clorexidina y secadas antes del calzado de los guantes los cuales fueron estériles.

ANEXO 07

En el presente trabajo se respetó el principio de ética adoptado en el capítulo 6 del código de ética del Colegio Médico del Perú, Art 48.²⁹

Art. 48: “El médico debe presentar la información proveniente de una investigación médica, para su publicación, independientemente de los resultados, sin incurrir en falsificación ni plagio y declarando si tiene o no conflicto de interés”.

ANEXO 08

Efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *malva sylvestris* L. “malva”
sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 comparado con gentamicina, estudio in vitro

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente:							
(I) VAR00001			Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
T3 Dunnett	25,00	50,00	-4,60000*	1.25786	0.043	-9.0675	-0.1325
		75,00	-13,40000*	0.22111	0.000	-	-
						14.1853	12.6147
		100,00	-15,70000*	0.39581	0.000	-	-
						17.1058	14.2942
	50,00	200,00	-21,50000*	0.30732	0.000	-	-
						22.5915	20.4085
		25,00	4,60000*	1.25786	0.043	0.1325	9.0675
		75,00	-8,80000*	1.27715	0.000	-	-4.3269
						13.2731	
	75,00	100,00	-11,10000*	1.31867	0.000	-	-6.5972
						15.6028	
		200,00	-16,90000*	1.29486	0.000	-	-
						21.3830	12.4170
		25,00	13,40000*	0.22111	0.000	12.6147	14.1853
	100,00	50,00	8,80000*	1.27715	0.000	4.3269	13.2731
		100,00	-2,30000*	0.45338	0.002	-3.7763	-0.8237
		200,00	-8,10000*	0.37859	0.000	-9.3075	-6.8925
		25,00	15,70000*	0.39581	0.000	14.2942	17.1058
	200,00	50,00	11,10000*	1.31867	0.000	6.5972	15.6028
		75,00	2,30000*	0.45338	0.002	0.8237	3.7763
		200,00	-5,80000*	0.50111	0.000	-7.3907	-4.2093
		25,00	21,50000*	0.30732	0.000	20.4085	22.5915
		50,00	16,90000*	1.29486	0.000	12.4170	21.3830
		75,00	8,10000*	0.37859	0.000	6.8925	9.3075
		100,00	5,80000*	0.50111	0.000	4.2093	7.3907

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO 09

Efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *malva Sylvestris* L. “malva” sobre cepas de *escherichia coli* ATCC 8739 comparado con gentamicina, estudio in vitro

PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
	Se basa en la media	62,254	4	45	0,000
	Se basa en la mediana	6,122	4	45	0,001
VAR00002	Se basa en la mediana y con gl ajustado	6,122	4	11,641	0,007
	Se basa en la media recortada	58,082	4	45	0,000

Fuente reporte de resultados del SPSS versión 25